

长期不同施肥潮土活性有机氮库组分与酶活性 对外源牛粪的响应

戚瑞敏, 温延臣, 赵秉强, 林治安, 李志杰, 李娟*

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所/农业农村部植物营养与肥料重点实验室, 北京 100081)

摘要:【目的】研究不同施肥制度下潮土中活性有机氮库及酶活性对新添加有机物料响应机制, 可深入理解不同施肥制度培肥土壤、提高土壤基础地力的机理。【方法】供试土壤采集于从 1986 年开始的长期定位试验处理, 包括 CK (不施肥)、OF (常量有机肥)、CF (常量化肥)、OCF (常量有机无机配施) 4 个处理。通过室内恒温培养试验, 研究添加等氮量牛粪后长期不同施肥潮土有机氮库组分 (微生物量氮、可溶性有机氮和颗粒有机氮) 含量及土壤酶 (α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、 β -木糖苷酶、纤维二糖水解酶、磷酸酶、过氧化物酶和酚氧化酶) 活性的变化特征。【结果】首先, 无论添加牛粪与否, 土壤全氮、可溶性有机氮和颗粒有机氮含量均随培养时间呈上升趋势或与初始时期差异不显著; 添加牛粪的长期不施肥与施化肥处理土壤微生物量氮含量显著低于相同处理不添加牛粪的土壤微生物量氮含量。其次, 培养结束后, 添加牛粪增加了长期不同施肥潮土全氮、可溶性有机氮和颗粒有机氮含量, 分别提高了 5.43%~15.49%、5.83%~69.42% 及 9.75%~42.29%, 却降低了土壤微生物量氮含量 16.91%~62.10%。另外, 施肥、添加牛粪及其交互作用对土壤酶活性具有显著影响 ($P < 0.05$); 无论添加牛粪与否, 不同施肥处理土壤氧化酶 (过氧化物酶和酚氧化酶) 活性显著低于不施肥处理, 不同施肥处理的土壤水解酶活性却呈现不同的变化趋势。不添加牛粪情况下, 长期施肥显著提高了除 β -葡萄糖苷酶以外的土壤水解酶活性; 其中与长期不施肥处理相比, 长期施用化肥土壤 β -木糖苷酶和 β -纤维素酶分别提高了 208.74% 和 180.75%。添加牛粪情况下长期施用有机肥土壤 β -葡萄糖苷酶和 β -纤维素酶比不施肥分别提高了 201.40% 和 308.04%; 冗余分析 (redundancy analysis, RDA) 显示, 添加与不添加牛粪条件下土壤酶活性的关键环境驱动因子不同, 在不添加牛粪时为可溶性有机氮, 添加后其关键驱动因子为全氮和可溶性有机氮。【结论】不同施肥制度下土壤微生物量氮、可溶性有机氮、颗粒有机氮与土壤全氮之间呈显著正相关; 室内好气培养条件下, 添加牛粪显著提高了长期不同施肥潮土的全氮、可溶性有机氮、颗粒有机氮含量, 却显著降低了土壤微生物量氮含量; 不同施肥制度下土壤酶活性差异显著, 牛粪的添加改变了影响长期不同施肥潮土酶活性的关键环境因子。

关键词: 施肥制度; 牛粪; 活性有机氮库; 土壤酶活性

Response of soil organic nitrogen fractions and enzyme activities to cattle manure addition in long-term fertilized fluvo-aquic soil

QI Rui-min, WEN Yan-chen, ZHAO Bing-qiang, LIN Zhi-an, LI Zhi-jie, LI Juan*

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilizer, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100081, China)

Abstract: 【Objective】 We investigated the effects of cattle manure addition on fluvo-aquic soil labile organic nitrogen fractions and soil enzyme activities by using indoor incubation method, to reveal the mechanisms of cattle manure on soil organic nitrogen fractions in different fertilization treatments. This research not only provides theoretical basis for rational application of organic fertilizer and sustainable development of agricultural ecosystem, but also is beneficial to reusing agricultural resources and maximizing their benefits.

收稿日期: 2018-12-18 接受日期: 2019-03-04

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1610132016041)。

联系方式: 戚瑞敏 E-mail: qirui529@163.com; * 通信作者 李娟 E-mail: lijuan02@caas.cn

【 Method 】 An indoor incubation was used to study changes of soil liable organic nitrogen fractions (microbial biomass nitrogen (MBN), dissolved organic nitrogen (DON) and particulate organic nitrogen (PON)) and soil enzyme (α -1,4-glucosidase, AG; β -1,4-glucosidase, BG; β -1,4-xylosidase, BXYL; cellobiohydrolase, CBH; phosphatase, PHOS; peroxidase, perox; and phenol oxidase, phenox) activities in a long-term fertilizer experiment established in 1986 in Yucheng site, Shandong province, China. There were 4 treatments in the long-term fertilizer experiment, including no-fertilizer treatment (CK), standard rate of organic manure treatment (OF), standard rate of mineral fertilizer (CF), and half-standard rate of organic manure plus half-standard rate of mineral fertilizer treatment (OCF). **【 Results 】** Firstly, regardless of cattle manure addition, the contents of total nitrogen (TN), DON and PON in different fertilized soils were increased or had no significant differences during the incubation time. Secondly, the contents of total nitrogen (TN), DON and PON in different fertilized treatments with cattle manure addition were increased by 5.43%–15.49%, 5.83%–69.42% and 9.75%–42.29%, respectively, after incubation, while the content of MBN was decreased by 16.91%–62.10%. Fertilization, cattle manure addition and their interactions had significant effects on soil enzyme activity ($P < 0.05$). Regardless of cattle manure addition, the activity of soil oxidase enzymes (perox and phenox) in all fertilizer treatments was significantly lower than that of no-fertilizer treatment, but the activities of soil hydrolytic enzymes in all fertilizer treatments presented different trends. Without cattle manure addition, the activities of soil hydrolytic enzymes except BG significantly increased in long-term fertilizer treatments; compared with CK, the activities of BXYL and CBH in CF increased by 208% and 180%, respectively. With cattle manure addition, compared with CK, the activities of BG and CBH in OF increased by 201% and 308% respectively. According to the redundancy analysis (RDA), the dominant environmental factor of TN and soil labile organic nitrogen fractions affecting soil enzyme activities was DOC without cattle manure addition. However, the dominant environmental factors were changed to TN and DOC with cattle manure addition. **【 Conclusions 】** The contents of MBN, DON and PON were significantly correlated with soil TN under long-term fertilization regimes. With cattle manure addition, the contents of TN, DON and PON increased in different fertilized treatments, but the content of MBN significantly decreased. Soil enzyme activities in different fertilized treatments were significantly different, and cattle manure addition changed the dominant factors of TN and soil labile organic nitrogen fractions affecting soil enzyme activities in different fertilization regimes.

Key words: long-term fertilization regimes; cattle manure; soil organic nitrogen pool fractions; soil enzyme activities

氮是地球上最丰富的化学元素和植物生长必需的营养元素之一。氮循环是农业生态系统中最基本的物质循环过程,对农业生态系统的稳定性、生产力及其环境效应具有关键性的作用^[1-2]。施肥是影响土壤质量演化及其可持续利用最为深刻的农业措施之一^[3],长期施肥不仅能够提高土壤供氮能力,还能稳定土壤氮库,促进土壤“供氮、保氮”,使进入土壤中的氮迅速转化为土壤的活性氮库和稳定氮库^[4-5]。土壤活性有机质(微生物量、可溶性有机质及颗粒有机质)中的氮组分,即微生物量氮(MBN)、可溶性有机氮(DON)和颗粒有机氮(PON)被认为是土壤活性氮库中的重要组分,在土壤氮循环过程中起着非常重要的作用^[6-9]。了解长期不同施肥土壤活性有机氮库组分来源及外源碳添加对其参与土壤氮循

环的动态转化过程及特征尤为重要。

土壤有机氮库是土壤氮库的主要存在形式,约占土壤氮库的85%,是土壤氮素的主体与作物必需氮素的主要来源^[10],主要受土壤质地和类型、种植制度、农艺方式(耕作、施肥、灌溉等)及气热条件等环境因素的影响,外界环境因素不同,土壤生态系统有机氮库的动态平衡不同,其各组分的物理、化学性质和对作物的有效性也不同^[4,8,11-12]。土壤有机氮库组分是土壤有机氮的重要化学形态,按照提取方法(物理、化学、生物)、组成成分及活性程度不同,有不同的定义与分级^[13]。国内外常用的土壤有机氮的分级是Bremner1965年提出的方法,主要根据土壤有机氮的化学形态组成成分将有机氮分为氨态氮、氨基酸态氮、氨基糖态氮、酸解未知氮和酸不

溶氮, 且对不同生境条件及农艺措施对土壤有机氮分级特征的影响进行了广泛研究^[9, 14-16]。近些年, 有研究根据物理-化学分组方法将土壤有机氮分为未保护游离态颗粒、物理保护、化学保护及生物化学保护有机氮组分^[17-18]并进行了深入研究^[19-20]。根据活性程度不同, 土壤有机氮库可分为活性有机氮库与惰性有机氮库^[5, 21-22]; 而活性有机氮组分中, 颗粒有机氮 (PON)、可溶性有机氮 (DON)、轻组有机氮 (LFON) 以及微生物量氮 (MBN) 被认为是土壤活性氮库中的重要组成成分^[7, 23]。国内外对不同生态系统土壤有机氮库单个组分研究较多^[2], 但仅限于单个组分“数量”或“含量”的研究, 而对不同生境条件下土壤活性氮库组分的系统研究较少, 对其参与土壤氮循环过程中调控机制的“质”方面的研究更少^[15, 24]。前人研究表明, 土壤可溶性有机氮及提取态有机氮参与了土壤氮矿化过程, 且动态转化过程一致, 对土壤氮矿化起着重要作用^[9, 25], 农田土壤中, DON 占土壤全氮的 0.15%~0.19%^[26], 虽然土壤可溶性氮在土壤全氮中的占比很小, 但是却被认为是参与动态变化及生物可利用矿质氮源中最重要的部分^[27]; 有机肥、秸秆还田等措施增加了土壤可溶性氮及提取态有机氮含量^[25]。颗粒态有机氮 (PON) 占土壤氮的比例主要在 1.5%~10.0%^[28], 其短期内动态变化能够反映土壤氮循环特性^[29-30]。¹⁵N 标记秸秆示踪研究表明, PON 的矿化是农业土壤矿质氮的主要来源, 矿化速率受作物秸秆的 C/N 比及土壤特性等影响^[9]。Hurisso 等^[31]的研究表明, 由长期耕作导致的土壤活性氮的退化单靠免耕是不能恢复的, 指出需通过外源物添加提高土壤活性有机氮库。

土壤有机氮的转化主要是土壤微生物及其分泌的酶共同作用的结果^[32], 因此, 对土壤酶参与有机氮矿化的生物学机制的深入了解有利于从本质上认识不同土壤有机氮矿化差异的来源。大量研究表明, 施肥尤其是施用有机肥能直接或间接地影响土壤酶活性^[33-34]。前期研究结果表明, 与不施肥相比, 施用有机肥能显著增加土壤水解酶[α -葡萄糖苷酶 (AG)、 β -葡萄糖苷酶 (BG)、 β -木糖苷酶 (BXYL)、纤维二糖水解酶 (CBH) 和磷酸酶 (PHOS)]活性, 却显著降低了土壤酚氧化酶 (phenox) 活性, 且施用有机肥对土壤酶活性的影响随有机肥施用量的增加而增加^[35]。长期不同施肥土壤中有有机氮库和酶活性不同, 其对添加外源有机物的响应不同, 参与外源有机物分解转化的过程及其调控机制也有所不同。因此, 本研究以始建于 1986 年的长期定位施肥试验为平台, 通过室内培养试验研究添加牛粪条件下, 不同施肥制度

潮土活性有机氮库及酶活性变化特征, 揭示不同施肥潮土活性有机氮库对牛粪的响应机制, 为提升土壤肥力, 维持土壤生态平衡和改善土壤生物学特性提供理论依据, 对于实现资源利用及农业可持续发展具有重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 试验设计

供试土壤采自于中国农业科学院德州实验站禹城试验基地的有机无机配比长期定位试验 (建于 1986 年 10 月), 该试验地位于华北平原东部 (东经 116°34'、北纬 36°50'), 光热资源丰富, 太阳辐射总量 5225 MJ/m², 年日照时数 2640 h, $\geq 0^{\circ}\text{C}$ 积温 4951 $^{\circ}\text{C}$, $\geq 10^{\circ}\text{C}$ 积温 4441 $^{\circ}\text{C}$, 年平均气温 13.1 $^{\circ}\text{C}$; 雨热同期, 年平均降雨量 570 mm, 水面蒸发量 2094 mm, 无霜期 206 天; 属暖温带半湿润季风气候。试验地的土壤类型为潮土, 成土母质为黄河冲积物, 耕层质地轻壤 (黏粒含量 21.4%, 粉粒含量 65.6%, 砂粒含量 3.0%); 初始土壤 (0—20 cm) (1986 年) 的基本理化性状分别为: 有机碳 3.93 g/kg, 全氮 0.51 g/kg, 有效氮 37.5 mg/kg, 速效磷 7.5 mg/kg, 速效钾 73.0 mg/kg, 阳离子交换量 15.8 cmol/kg, 水溶性盐含量 0.96 mg/kg, pH 值 8.56。主要种植制度为冬小麦-夏玉米一年两熟制。试验设 6 个处理, 本研究选取其中的 4 个处理, 分别为: 1) 不施肥 (对照, CK); 2) 常量有机肥 (OF, 有机养分年施用 N 375~450 kg/hm²; P、K 按照有机肥氮量进行折算); 3) 常量化肥 (CF, 年施用 N 375~450 kg/hm²、P₂O₅ 225~300 kg/hm²、K₂O 150 kg/hm²); 4) 常量有机无机配施 (1/2 有机肥 + 1/2 化肥, OCF)。常量有机肥与化肥处理的年养分投入量相同, 每个处理重复 4 次, 小区之间用 0.8 m 的水泥挡板隔开, 小区面积 28 m² (4 m × 7 m)。具体作物品种、肥料性质、施肥措施及小区试验设计详见 Li 等^[36]的研究。

土壤样品于 2014 年 10 月玉米收获后取样, 每个小区随机选取 5~10 个点, 用土钻 (3 cm) 取 0—20 cm 的土样混匀, 装好用冰盒立即带回实验室并迅速测定土壤样品含水量。将土壤样品分成两部分, 一部分风干用于土壤理化性质的测定; 另一部分过 2 mm 筛并存于 4 $^{\circ}\text{C}$, 用于后续的室内培养试验。其理化性质见表 1。

选取对照 (CK) 和三个常量施肥处理 (OF、CF、OCF) 共 16 个土壤样品进行室内培养试验。称取相当于 100 g 干土重的鲜土 (培养前将土壤含水量调至

表 1 2014 年玉米收获后各处理土壤化学性状
Table 1 Chemical properties of soils in each treatment after maize harvest in 2014

处理 Treatment	pH	有机碳 (g/kg) SOC	全氮 (g/kg) TN	有效磷 (mg/kg) Available P	速效钾 (mg/kg) Available K	碳氮比 C/N
CK	8.67 ± 0.10 a	5.01 ± 0.39 d	0.81 ± 0.01 d	5.26 ± 0.56 d	94.20 ± 5.86 c	6.18 ± 0.43 b
OF	8.40 ± 0.02 b	14.88 ± 0.65 a	1.74 ± 0.02 a	159.24 ± 15.8 a	126.17 ± 2.84 a	8.56 ± 0.32 a
CF	8.34 ± 0.04 b	5.90 ± 0.10 c	0.96 ± 0.04 c	20.27 ± 0.44 c	110.19 ± 2.46 b	6.15 ± 0.35 b
OCF	8.31 ± 0.08 b	10.20 ± 0.41 b	1.30 ± 0.02 b	70.89 ± 7.76 b	99.12 ± 4.02 c	7.84 ± 0.41 a

注 (Note): CK—不施肥对照 No fertilizer input; OF—有机肥 Organic fertilizer; CF—化肥 Chemical fertilizer; OCF—有机无机肥配施 Half organic and half chemical fertilizer; 年施用 Annual input N 375~450 kg/hm²、P₂O₅ 225~300 kg/hm²、K₂O 150 kg/hm²; 同列数据后不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$) Values followed by different letters in the same column are significantly different among treatments ($P < 0.05$).

田间含水量的 60%) 于 250 mL 培养瓶中分别进行不添加 (M0) 和添加牛粪 (M1) 两个处理的培养试验, 同时用不添加土壤的培养瓶作为对照, 在 25℃ 恒温培养箱中培养 79 天, 每个土壤样品设 2 个重复, 定期打开培养瓶塞通气, 使瓶内气体与大气进行充分交换, 同时用称重法调节土壤含水量使其保持田间含水量的 60%。在培养第 25 天及 79 天时, 取出土样保存于 4℃ 下用于土壤全氮及活性有机氮库组分的测定分析, 并测定第 79 天土壤酶活性。

牛粪选用 2014 年禹城当地畜牧养殖场腐熟牛粪, 主要养分含量为碳 (C) 21.5%、氮 (N) 1.67%、磷 (P₂O₅) 2.68%、钾 (K₂O) 1.57%, 碳氮比 (C/N) 为 12.88, 牛粪的施用量按与长期定位施肥中常量化肥施氮量等量折算, 为每 kg 干土施 N 0.2 g。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 土壤全氮 采用凯氏定氮法。土样经浓硫酸消煮后, 再将碱化蒸馏出来的氨用硼酸吸收, 以标准酸溶液滴定, 求土壤全氮含量。

1.2.2 微生物量氮 (MBN) 土样经氯仿熏蒸-K₂SO₄ 浸提后, 用 TOC/N 自动分析仪 (Multi N/C @205 3100, 德国耶拿) 测定。称取预培养后的新鲜土壤于小烧杯中, 将其置于真空抽滤器中用去乙醇氯仿在 25℃ 的培养箱中避光熏蒸 24 h。然后反复抽滤几次以去除氯仿, 将熏蒸的土壤样品用 0.5 mol/L K₂SO₄ 溶液振荡浸提, 与此同时以相同的方法提取未熏蒸的土壤, 浸提液用 TOC/N 自动分析仪 (Multi N/C @205 3100, 德国耶拿) 测定。微生物量氮计算公式: $B_N = E_N / K_{EN}$ 。其中, E_N 为熏蒸和未熏蒸土壤的差值; K_{EN} 为转换系数, 取值 0.45^[38-39]。

1.2.3 可溶性有机氮 (DON) 0.5 mol/L K₂SO₄ 提取法-TOC/N 自动分析仪 (Multi N/C @205 3100, 德国耶拿) 测定。

称取相当于 10 g 干土的鲜土于 125 mL 的塑料瓶中, 加入 50 mL 0.5 mol/L K₂SO₄, 在往复振荡机中振荡 (250 r/min) 提取 1 h, 然后 2500 r/min 离心 15 min, 上清液通过真空泵抽滤过 0.45 μm 的滤膜后, 用 TOC/N 自动分析仪 (Multi N/C @205 3100, 德国耶拿) 测定其 DON 含量^[40-41]。

1.2.4 颗粒态有机氮 (PON) 采用 5 g/L 六偏磷酸钠提取法测定。称取过 2 mm 筛的风干土 10 g 于 125 mL 的塑料瓶中, 加入 30 mL 5 g/L 的六偏磷酸钠溶液, 在往复振荡机中振荡 18 h (90 r/min), 分散。分散液置于 53 μm 的筛上, 用蒸馏水冲洗至滤液澄清。将筛上 53~2000 μm 的土样冲洗至烧杯中, 60℃ 烘干至恒重, 计算其占整个土壤样品的百分比, 并测定烘干样品中的全氮含量, 将烘干样品中的土壤全氮含量换算成整个土壤样品的对应的颗粒态氮组分含量^[42]。

1.2.5 土壤酶活性的测定 荧光微孔板酶活性分析法能够在短时间内测定大批量的土壤样品和多种酶活性, 近年来被广泛应用于不同生态系统的土壤酶活性研究中^[37]。本研究中, 测定了参与土壤碳氮磷循环的 7 种土壤酶活性, 其中包括 α-葡萄糖苷酶 (α-1,4-glucosidase, AG)、β-葡萄糖苷酶 (β-1,4-glucosidase, BG)、β-木糖苷酶 (β-1,4-xylosidase, BXYL)、纤维二糖水解酶 (cellobiohydrolase, CBH) 和磷酸酶 (phosphatase, PHOS) 5 种水解酶及过氧化物酶 (peroxidase, perox) 和酚氧化酶 (phenol oxidase, phenox) 2 种氧化还原酶。

利用黑色微孔板测定了 7 种水解酶活性, 并根据 DeForest^[43]的研究方法, 对使用的缓冲液稍作调整。具体步骤如下: 称取相当于 1.0 g 干土重的鲜土于 200 mL 的塑料瓶中, 加入 125 mL 去离子水作为缓冲液, 在振荡机上振荡 30 min, 制成均质泥浆。

然后用排枪加 200 μL 土壤悬浮液于 96 孔微孔板中 (每个样品做 8 个平行), 整个过程需用磁力搅拌器搅匀土壤悬浮液。样品分析孔中加入 200 μL 土壤悬浮液和 50 μL 底物溶液; 阴性对照孔中加入 200 μL 缓冲液和 50 μL 底物溶液; 样品对照孔中加入 200 μL 土壤悬浮液和 50 μL 缓冲液; 标准孔中加入 200 μL 缓冲液和 50 μL 标准溶液 (10 mmol/L 的 4-甲基伞形酮); 淬灭对照孔中加入 200 μL 土壤悬浮液和 50 μL 标准溶液。将微孔板于 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下培养 4 小时, 随后用酶标仪 (Scientific Fluoroskan Ascent FL, Thermo) 检测荧光值, 检测的激发光和发射光波长分别为 365 nm 和 450 nm。土壤酶活性[nmol/(g·h)]用单位时间内每克土样转化底物的 nmol 数表示。

过氧化物酶、酚氧化酶活性用 L-DOPA 作为底物在白色微孔板中进行测定^[43-44]。空白对照孔中加入 250 μL 缓冲液; 阴性对照孔中加入 200 μL 缓冲液和 50 μL 的 L-DOPA 溶液 (浓度为 25 mmol/L); 样品对照孔中加入 200 μL 土壤悬浮液和 50 μL 缓冲液; 样品分析孔中加入 200 μL 土壤悬浮液和 50 μL 的 L-DOPA 溶液。对于过氧化物酶活性的分析, 每个孔中均需加入 10 μL 0.3% 的双氧水。将白色微孔板置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下培养 20 h, 随后用酶标仪在 450 nm 的波长下测定吸光度, 其活性用 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 表示。

1.3 数据处理

采用 Origin8 作图, 分析土壤活性有机氮组分的变化特征; 用 Canoco5 进行冗余分析, 研究土壤酶活性与活性有机氮库组分之间的关系; 采用 Excel 2013 及 SAS 8.0 软件进行统计分析, LSD 法检验差异显著性 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同施肥制度土壤活性有机氮库的变化特征

土壤活性有机质中的氮组分作为土壤活性氮库中的重要组成成分, 受施肥的影响较大。长期施肥 28 年后, 与长期施化肥 (CF) 及不施肥处理 (CK) 相比, 长期施有机肥 (OF) 能显著提高土壤活性有机氮库组分 (MBN、DON 和 PON) 含量, 长期施化肥处理 (CF) 效果不及长期施有机肥 (OF) 及有机无机配施处理 (OCF), OCF 中的 DON 含量最高, CK 和 OF 中 MBN 的含量差异不显著 (图 1), 这与本课题组之前报道一致^[5]。这说明施肥有利于土壤活性氮的储存, 特别是 PON 的含量, 有利于提高土壤的供氮能力。研究表明, 长期施肥土壤活性氮库组分

(MBN、DON 和 PON) 与土壤全氮含量之间均呈显著性正相关, 且活性有机氮库组分相互之间也显著正相关 (表 2)。

2.2 牛粪对不同施肥土壤有机氮库的影响

由图 1 可以看出, 培养期间, 土壤 TN 及 PON 含量变化趋势在各处理中均为: OF > OCF > CF > CK ($P < 0.05$); OF 处理中无论添加牛粪与否, TN 及 PON 含量均随着时间的延长呈先降低后逐渐平稳趋势 (图 1); 在不添加牛粪情况下, 除 OF 处理的 PON 含量显著下降外 ($P < 0.05$), CF, OCF 和 CK 处理的 PON 含量随培养时间的延长变化不显著; 与不添加牛粪相比, 添加牛粪显著增加了 OCF、CF 及 CK 处理中 TN 及 PON 含量 ($P < 0.05$)。

除 OCF 处理外, 其他施肥处理土壤 MBN 含量随培养时间延长均为先增加再降低的趋势; OCF 处理中土壤 MBN 含量随培养时间延长逐渐降低。不添加牛粪处理的 CF 和 CK 处理土壤 MBN 含量始终显著高于添加牛粪处理 ($P < 0.05$), 但添加牛粪情况下, OF 和 OCF 处理土壤 MBN 含量在培养第 25 天均大于不添加牛粪处理, 在第 79 天时, MBN 含量均显著低于不添加牛粪处理 ($P < 0.05$) (图 1)。无论添加牛粪与否, 各施肥处理土壤 DON 含量随培养时间延长均呈上升趋势; 培养期间, 除 OF 外, 其他处理 DON 含量均为添加牛粪的处理与不添加牛粪处理的相当 (第 25 天) 或者高于不添加牛粪处理 (第 79 天), 而 OF 处理的 DON 含量表现为在第 25 天, 不添加牛粪处理的显著高于添加牛粪处理, 而到第 79 天, 添加牛粪的处理又高于不添加牛粪的处理。

连续培养 25 天, 与不添加牛粪相比, 添加牛粪显著增加了各处理土壤 TN 及 PON 含量, 对 CK 及 CF 处理的作用效果显著高于 OF 及 OCF 处理; 除 CF 处理外, 较不添加牛粪相比, 添加牛粪显著降低了其他处理的 DON 含量; 相反, 添加牛粪显著增加了 OF 及 OCF 处理 MBN 含量, 而显著降低了 CK 及 CF 处理含量 (图 2)。

培养 79 天后, 与不添加牛粪相比, 添加牛粪显著增加了各处理土壤 TN、DON 及 PON 组分含量, 分别提高了 5.43%~15.49%、5.83%~69.42% 和 19.75%~42.29%。图 2 显示, 添加牛粪对 CK 及长期施用化肥处理 (CF) 的影响比对长期施有机肥处理 (OF、OCF) 的影响明显。但添加牛粪显著降低了土壤 MBN 含量, 降低幅度为 16.91%~62.10%, 且对长期施有机肥处理 (OF、OCF) 的影响显著大于对

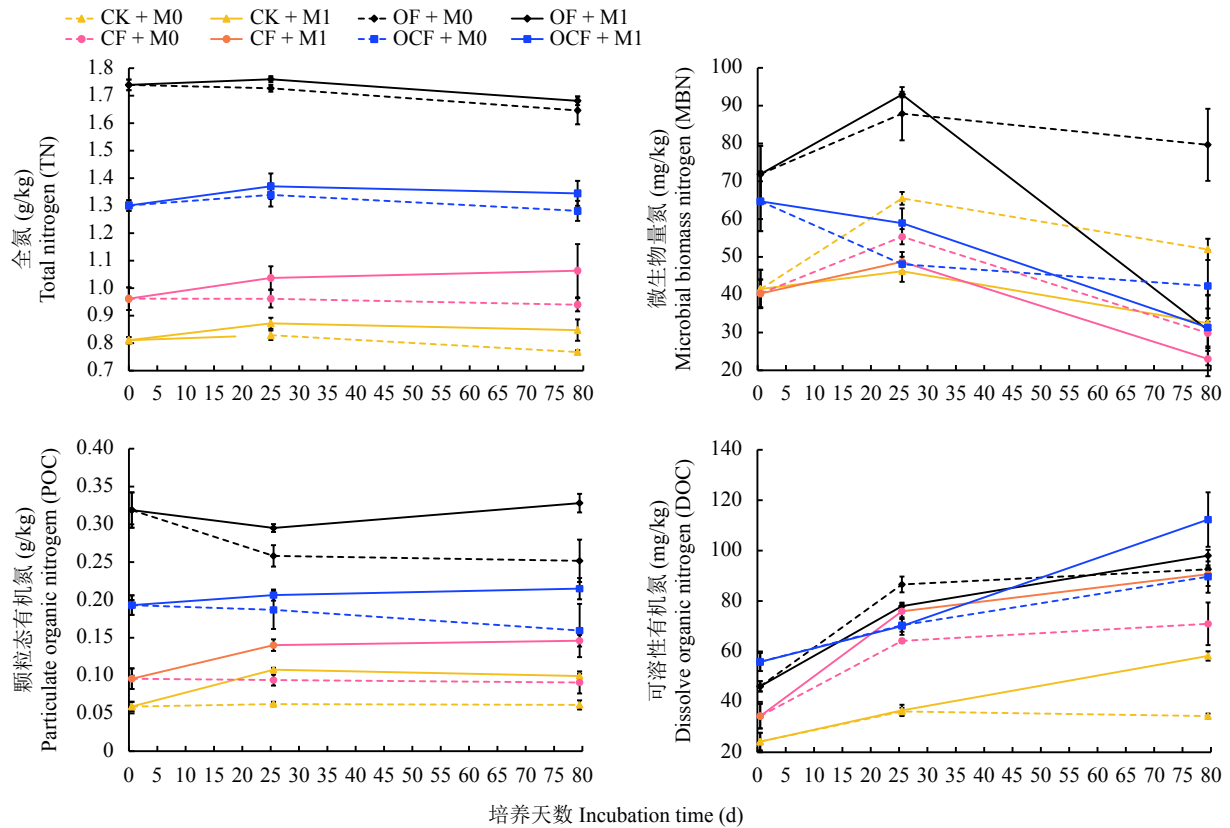


图 1 好气培养下添加牛粪对长期不同施肥土壤全氮及活性有机氮库组分含量的影响

Fig. 1 Dynamic changes of soil total N and labile organic nitrogen fractions in soils under different fertilizer patterns during incubation

[注 (Note): M0—不添加牛粪 No cattle manure addition; M1—每 kg 干土添加牛粪 N 0.2 g Adding cattle manure N 0.2 g/kg dry soil.]

表 2 长期不同施肥土壤活性有机氮库组分之间及其与土壤全氮含量间相关性分析 (P 值)

Table 2 Correlation analysis between soil total nitrogen and labile organic nitrogen fractions (P value)

项目 Item	微生物量氮 MBN	可溶性氮 DON	颗粒氮 PON
全氮 Total N	<0.0001	0.0018	<0.0001
微生物量氮 MBN		0.0003	0.0014
可溶性氮 DON			0.0055

CK 及 CF 的影响。

2.3 牛粪对不同施肥制度下土壤酶活性的影响

表 3 分析表明, 施肥、添加牛粪及其交互作用对土壤酶活性具有显著影响 ($P < 0.05$)。

为明确不同施肥处理下土壤酶活性的变化规律, 计算了添加与不添加牛粪处理的土壤酶活性的百分比差异 (图 3), 无论添加牛粪与否, 三个施肥处理土壤过氧化物酶和酚氧化酶活性显著低于对照土壤, 水解酶活性却呈现不同的变化趋势。不添加牛

粪培养, CF 处理土壤 β -木糖苷酶 (BXYL) 和 β -纤维素酶 (CBH) 分别提高了 209% 和 181%。添加牛粪培养, OF 处理土壤 β -葡萄糖苷酶 (BG) 和 β -纤维素酶 (CBH) 分别提高了 201% 和 308%。

2.4 添加牛粪土壤有机氮库与酶活性之间的相关性分析

将不同施肥制度土壤的 TN、MBN、DON、PON 和 SOC/TN (C/N) 作为自变量 (解释变量), 土壤酶活性作为因变量 (响应变量), 分别进行了添加和不添加牛粪条件下的冗余分析 (redundancy analysis, RDA)。在不添加牛粪时 (图 4), 解释变量可解释模型的 48.30%, 轴 1 和轴 2 分别占 36.95% 和 9.08%。施肥处理 (CF、OF、OCF) 的组群与 CK 处理显著分离, 分别在轴的正反两方向上, 并且不同施肥处理也显著分开。预选 (forward-selection) 结果表明, DON 是影响土壤酶活性变化的重要影响因素, 可以解释总变量的 34.40% ($P < 0.01$), 这可能是造成不同施肥处理之间分异的主要原因。

在添加牛粪的 RDA 模型中 (图 4), 解释变量占

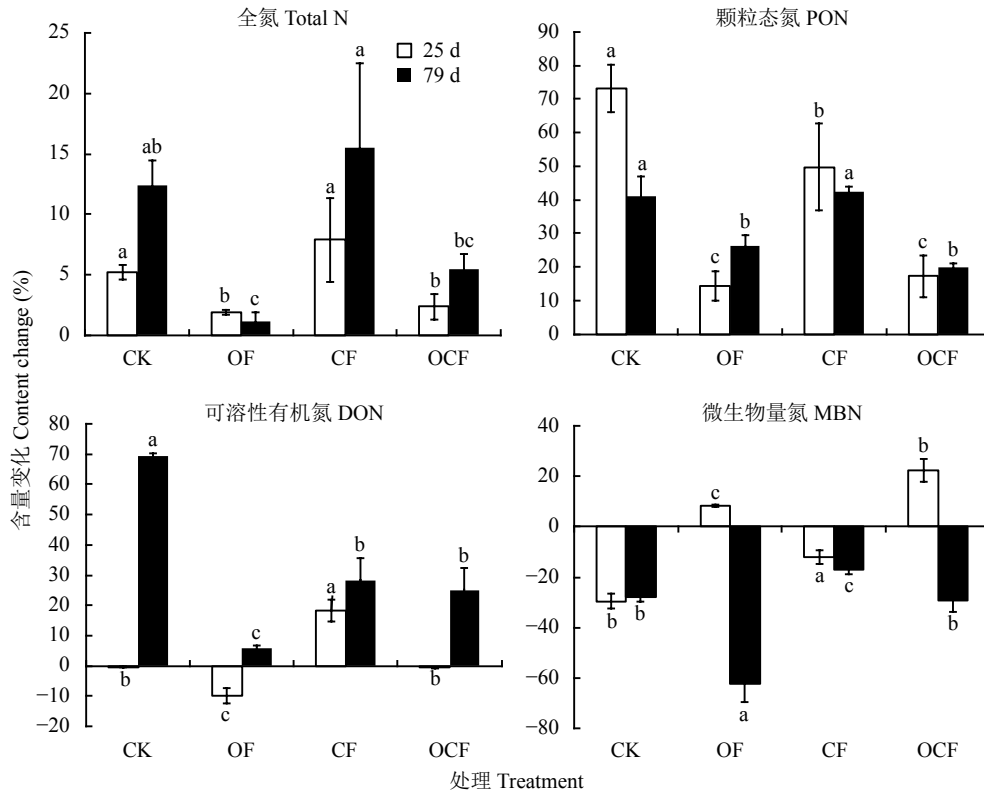


图 2 不同施肥处理土壤添加牛粪培养后全氮及有机氮组分含量的相对变化

Fig. 2 Relative change of total N and organic N fractions affected by cattle manure addition in soils under different fertilization patterns

[注 (Note): 含量变化 (%) = (添加牛粪 - 不添加牛粪) / 不添加牛粪 × 100; 方柱上不同字母表示处理之间差异显著。Content change (%) = $(N_{\text{manure addition}} - N_{\text{no manure addition}}) / N_{\text{no manure addition}} \times 100$; Different small letters above the bars indicate significantly different among treatments ($P < 0.05$).]

表 3 施肥、添加牛粪对土壤酶活性变化的影响 (培养第 79 天)

Table 3 Effect of fertilization pattern and manure addition on soil enzyme activities (Incubating 79 days)

双因素方差分析 Two-way ANOVA	施肥 Fertilization pattern (F)		添加牛粪 Adding manure (M)		F × M	
	F 值 F value	P 值 P value	F 值 F value	P 值 P value	F 值 F value	P 值 P value
α-葡萄糖苷酶 AG	9.21	0.0002	1167.19	<0.0001	298.70	<0.0001
β-葡萄糖苷酶 BG	4.15	0.0153	10.89	0.0027	5.84	0.0016
β-木糖苷酶 BXYL	6.08	0.0027	25.60	<0.0001	10.96	<0.0001
β-纤维素酶 CBH	6.95	0.0013	12.80	0.0013	8.41	0.0002
磷酸酶 PHOS	12.63	<0.0001	8.34	0.0076	11.56	<0.0001
过氧化物酶 Perox	8.77	0.0003	107.44	<0.0001	33.44	<0.0001
酚氧化酶 Phenox	16.17	<0.0001	114.80	<0.0001	40.83	<0.0001

总变量的 80.50%，轴 1 和 2 的特征根分别解释了变异的 56.85% 和 18.89%。OF、OCF 处理与 CK、CF 处理分离显著，分别在轴的正反两个方向上。OF 与 OCF 之间以及 CK 和 CF 处理之间均有明显的分离。预选结果显示 TN 和 DON 是添加牛粪时较好的解释变量因子，能分别解释土壤酶活性变异的

56.48% ($P < 0.01$) 和 18.28% ($P < 0.01$)。

整体来看，预选模型表明，在土壤全氮和活性有机氮库组分这些环境因子中，添加与不添加牛粪下土壤酶活性的关键驱动因子不同，不添加牛粪条件下可溶性有机氮 DON 为主要影响因子，添加后其关键影响因子为全氮 TN 和可溶性有机氮 DON。

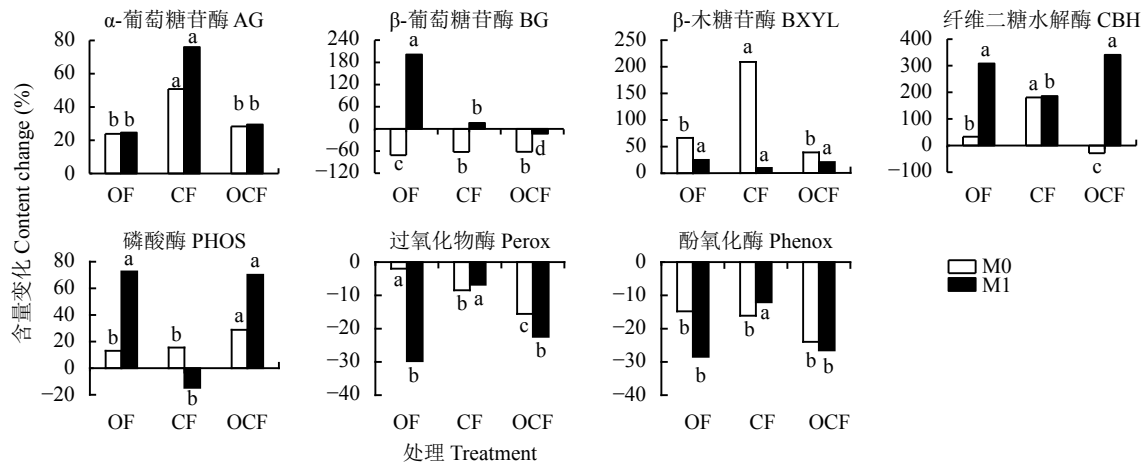


图3 添加牛粪对各施肥处理土壤酶活性的影响

Fig. 3 Effect of cattle manure addition on the enzyme activities of soils from different fertilization patterns

[注 (Note) : ΔA (%) = $(A - A_{ck}) / A_{ck} \times 100$, A—施肥处理土壤酶活性 Enzyme activity in soil from fertilization treatment; A_{ck} —不施肥土壤酶活性 Enzyme activity in soil from CK; M0—不加牛粪培养 No manure addition; M1—加牛粪 Manure addition; 柱上或柱下不同小写字母表示添加或者不添加牛粪条件下各施肥处理之间差异显著 Different lower-case letters above the bars or under the bars indicate significant differences among treatments with or without cattle manure addition ($P < 0.05$).]

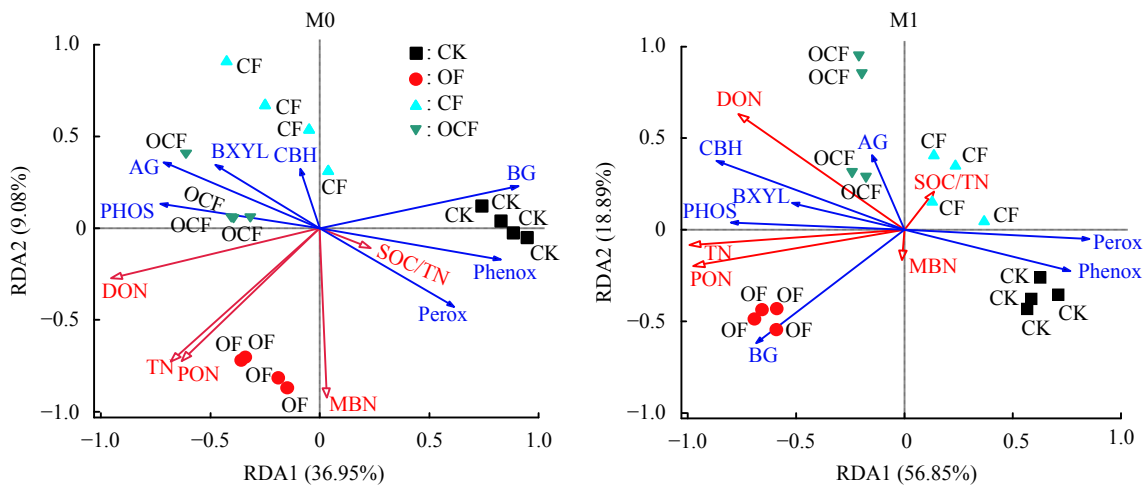


图4 不同施肥制度土壤酶活性和全氮及有机氮库组分之间的冗余分析

Fig. 4 Redundancy analysis of soil enzyme activities constrained by TN and organic nitrogen fractions in soils from different fertilization regimes after 79 days of incubation

[注 (Note) : M0—不加牛粪 No manure addition; M1—加牛粪 Manure addition.]

3 讨论

土壤可溶性有机氮被用作土壤供氮能力的评价指标及施肥等农艺措施对土壤变化影响的生物指示指标^[45]。探讨土壤全氮中随时间变化的活性部分, 如土壤微生物量氮, 能较好地反映由于固定-矿化过程而改变养分有效性动力的土壤质量和生产能力^[46-47], 还能较好地估计由于管理措施而引起的氮素矿化潜力变化^[48-49]。颗粒态有机氮 (PON) 被认为是处于活性和慢性氮组分之间的中间体, 也会随着土壤管理措施的改变作出迅速的响应^[48]。

我国区域广阔, 各地分布了多个长期定位实验, 涵盖了全国不同的土壤类型、气热条件及种植制度。目前为止, 已有不少关于不同施肥类型及水平对土壤有机氮库影响的研究工作, 可以总结为: 长期施肥均能显著增加土壤微生物量氮^[50-53]、耕层颗粒有机氮含量及储量^[54]。黄威等^[8]以湖南 3 个长期定位试验点为研究对象, 指出长期单施化肥、单施有机肥及有机无机配施均能提高红壤活性有机氮含量, 且随有机肥施用量的增加而增加; 土壤活性氮与全氮的积累速率呈极显著相关。不同种植制度下, 北京褐潮土区长期撂荒土壤微生物量氮含量显

著高于农田土壤^[50], 且在农田土壤中, 长期轮作的土壤微生物量氮含量要高于长期连作的; 韩晓日等^[55]指出施有机肥对黑土土壤微生物量氮贡献大, 施化肥对土壤微生物量氮的贡献较小, 土壤氮是微生物量氮的主要来源, 有机无机配施介于二者之间。本课题组以往研究^[5]表明, 长期施用有机肥显著提高了黄淮海潮土土壤全氮、土壤微生物量氮、可溶性有机氮和颗粒有机氮含量, 且土壤全氮及其活性氮组分的含量随有机肥或化肥施用量的增加而增加。颗粒态氮占土壤全氮的比例最高, 为 6.6%~18.6%; 其次为微生物量氮, 为 6.8%~8.8%; 可溶性有机氮占比最低。这表明, 施肥措施不同, 对土壤有机氮库组分含量影响及肥料在有机氮库组分中的分配不同^[13]。本研究中, 微生物量氮、可溶性有机氮和颗粒有机氮与土壤全氮表现出一致的趋势, 均随着有机肥施用量的增加而增加, 与前人结果相似^[50]。有机氮积累过程中, 有机肥主要进入土壤颗粒态氮库^[5], 而化肥可提高土壤微生物量氮在土壤氮库中的百分比^[55]。

本研究表明, 培养时间及外源有机物料对长期不同施肥土壤活性有机氮库组分的影响也差异显著, 影响程度取决于氮源和碳源(能源)的供应强度。添加新鲜的有机物料后, 土壤碳源充足, 激发了土壤微生物的大量生长, 生物量氮增加, 但当新鲜有机物料被消耗到一定程度后, 微生物能利用的易分解有机碳源已耗尽, 很快转入利用较难分解的有机碳, 生物量氮下降, 呈现周期性的变化(图 1)^[56]。除土壤微生物量氮外, 其他土壤活性氮组分普遍呈现随培养时间延长而逐渐增加趋势, 说明土壤微生物在分解有机物料的同时, 也分解土壤有机质, 转化为 PON, 释放出 DON, 从而增加了土壤全氮含量。

土壤肥力不同, 有机物料对土壤活性有机氮库含量的影响也不相同。本研究中, 培养结束后, 添加牛粪对长期施用有机肥土壤的影响效果不及其对长期施化肥及不施肥处理的影响。这与李世清等^[14]研究的结果一致, 他们认为土壤肥力不同, 有机物料对土壤微生物量氮的影响效果不同, 有机物料在低肥力土壤上的效果更加突出。胡玮等^[57]关于不同碳氮比有机物料对土壤肥力的影响研究表明, 碳氮比为 12.5 的有机物料配比更有利于提高低肥力土壤微生物量氮的含量, 这与我们的研究结果一致。本研究结果显示, 添加牛粪后, 长期不施肥与施化肥处理土壤微生物量氮含量显著低于相同处理不添加牛粪的土壤微生物量氮含量, 说明在一定的条件下, 牛粪限制了土壤氮向微生物量氮的转化, 且刺激了土壤微生物量氮向其他氮库的迁移和转化(图 1)。这与

韩晓日等^[55]研究结果一致, 指出单施有机肥降低了土壤微生物量氮来自土壤氮的百分比, 这可能与添加牛粪提高了土壤 C/N 有关。

土壤酶作为土壤生物活性及土壤肥力的重要组成部分, 在土壤物质循环和能量的转化中起着重要的催化作用, 其活性可快速反映施肥对土壤肥力和土壤质量的影响^[58-59]。本研究表明, 长期施肥对土壤酶活性影响很大。对于土壤 α -葡萄糖苷酶、 β -木糖苷酶 BXYL、 β -纤维素酶 CBH 和磷酸酶 PHOS 总体趋势是施肥的高于不施肥的。施肥之所以能提高土壤酶活性这是因为施肥可促进作物根系代谢, 使根系分泌物增多, 微生物繁殖加快, 从而有利于提高土壤酶活性^[60]。对长期施肥土壤酶活性进行 meta 分析表明, 施肥提高了土壤中与有机质分解相关酶(BG 和 NAG)的活性, 但对与氮循环相关的亮氨酸氨基肽酶(LAP)活性无显著影响。原因主要为, 施有机肥或化肥直接或间接增加了碳源, 促进微生物活动, 加速土壤碳循环, 提高了土壤中与有机质分解相关酶(BG 和 NAG)的活性^[61]。但是, 长期施肥却降低了土壤酚氧化酶和过氧化物酶的活性。这与孙瑞莲等^[62]报道类似, 但与高端等^[60]报道相反。这一结果可能与土壤类型、气候条件、种植制度等不同有关。

有研究表明, 可溶性有机态氮对碱性磷酸酶和蔗糖酶活性有显著影响^[63-64], 且土壤氮元素的富集减少了过氧化物酶基因的表达量^[65], 与我们的研究结果, 即土壤全氮和可溶性有机氮与土壤酶活性有极强的相关性一致。这说明土壤酶活性的变化与土壤养分的变化之间有直接的关系。土壤酶参与土壤中复杂的生物化学转化过程, 研究结果中各酶活性之间极强的相关性说明土壤中进行酶促反应的各土壤酶之间存在相互刺激机制^[66-67]。土壤可溶性养分作为土壤现实供肥能力的指示指标, 与土壤生物活动及酶活性关系密切^[65], 这也佐证了我们的研究中可溶性有机氮是调控土壤酶活性关键驱动因子的结果。王涛等^[64]研究的退耕刺槐林土壤养分与酶活性关系的结果, 表明土壤养分中全氮、总有机碳、可溶性有机氮对酶活性响应最大, 这与我们的研究结果一致。

4 结论

长期不同施肥模式显著影响土壤全氮和有机氮库对外源有机物料的响应。添加牛粪显著增加了长期不同施肥土壤全氮、可溶性有机氮和颗粒有机氮含量, 却显著降低了土壤微生物量氮含量; 其中,

长期施有机肥与有机无机配施处理对外源牛粪的添加响应显著。另外,添加牛粪显著增加了长期施有机肥处理土壤中的 β -葡萄糖苷酶(BG)和 β -纤维素酶(CBH)活性,显著降低了长期施有机肥及有机无机配施处理过氧化物酶(perox)和酚氧化酶(phenox)的活性。无论添加牛粪与否,不同施肥制度土壤酶活性之间差异显著;不添加牛粪情况下,土壤酶活性的驱动因子为可溶性有机氮,添加牛粪情况下,可溶性有机氮和全氮成为其关键驱动因子。因此,长期施有机肥及有机无机配施可提高作物对外源有机养分的吸收利用,提高土壤氮库存量,有利于氮素的长期储存。

参考文献:

- [1] Ju X T, Xing G X, Chen X P, *et al.* Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(9): 3041–3046.
- [2] Chen X P, Cui Z L, Fan M S, *et al.* Producing more grain with lower environmental costs[J]. *Nature*, 2014, 514(7523): 486–489.
- [3] 赵秉强, 李絮花, 李秀英. 施肥制度与土壤可持续利用[M]. 北京: 科学出版社, 2012.
Zhao B Q, Li X H, Liu X Y. Fertilization system and soil sustainable use[M]. Beijing: Science Press, 2012.
- [4] 郝晓晖. 长期施肥对亚热带稻田土壤有机碳氮及微生物学特性的影响[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2008.
Hao X H. Effects of long-term fertilization on soil organic carbon nitrogen and microbiological characteristics in subtropical paddy fields[D]. Wuhan: PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2008.
- [5] 宋震震, 李絮花, 李娟, 等. 有机肥和化肥长期施用对土壤活性有机氮组分及酶活性的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2014, 20(3): 525–533.
Song Z Z, Li X H, Li J, *et al.* Long-term effects of mineral versus organic fertilizers on soil labile nitrogen fractions and soil enzyme activities in agricultural soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2014, 20(3): 525–533.
- [6] Yan D Z, Wang D J, Yang L Z. Long-term effect of chemical fertilizer, straw, and manure on labile organic matter fractions in a paddy soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2007, 44(1): 93–101.
- [7] Sequeira C H, Alley M M, Jones B P. Evaluation of potentially labile soil organic carbon and nitrogen fractionation procedures[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(2): 438–444.
- [8] 黄威, 陈安磊, 王卫, 等. 长期施肥对稻田土壤活性有机碳和氮的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2014, 31(68): 208–218.
Huang W, Chen A L, Wang W, *et al.* Effect of long-term fertilization on active carbon and nitrogen in paddy soils[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 31(68): 208–218.
- [9] Luce M S, Whalen J K, Ziadi N, *et al.* Labile organic nitrogen transformations in clay and sandy-loam soils amended with ^{15}N -labelled faba bean and wheat residues[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 31(68): 208–218.
- [10] 朱兆良, 张绍林, 尹斌, 等. 太湖地区单季晚稻产量-氮肥施用量反应曲线的历史比较[J]. *植物营养与肥料学报*, 2010, 16(1): 1–5.
Zhu Z L, Zhang S L, Yin B, *et al.* Historical comparison on the response curves of rice yield-nitrogen application rate in Tai Lake Region[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2010, 16(1): 1–5.
- [11] 李海波, 韩晓增, 王凤. 长期施肥条件下土壤碳氮循环过程研究进展[J]. *土壤通报*, 2007, 38(2): 384–388.
Li H B, Han X Z, Wang F. Review of soil carbon and nitrogen cycling under long-term fertilization[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2007, 38(2): 384–388.
- [12] 王根林, 姬景红, 李玉梅. 土壤有机氮矿化的研究进展[J]. *黑龙江农业科学*, 2009, (6): 163–164.
Wang G L, Ji J H, Li Y M. Development and advance of soil organic nitrogen mineralization[J]. *Heilongjiang Agricultural Science*, 2009, (6): 163–164.
- [13] 吴汉卿, 张玉龙, 张玉玲, 等. 土壤有机氮组分研究进展[J]. *土壤通报*, 2018, 49(5): 1240–1246.
Wu H Q, Zhang Y L, Zhang Y L, *et al.* Soil organic nitrogen fractions: a review[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2018, 49(5): 1240–1246.
- [14] 李世清, 李生秀. 有机物料在维持土壤微生物体氮库中的作用[J]. *生态学报*, 2001, 21(1): 136–142.
Li S Q, Li S X. Effects of organic materials on maintaining soil microbial biomass nitrogen[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(1): 136–142.
- [15] 郝晓晖, 刘守龙, 童成立, 等. 长期施肥对两种稻田土壤微生物量氮及有机氮组分的影响[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(4): 757–764.
Hao X H, Liu S L, Tong C L, *et al.* The influence of long-term fertilization on microbial biomass nitrogen and organic nitrogen fractions in paddy soil[J]. *Science Agricultural Sinica*, 2007, 40(4): 757–764.
- [16] 郝晓晖, 胡荣桂, 吴金水, 等. 长期施肥对稻田土壤有机氮, 微生物量及功能多样性的影响[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(6): 1477–1484.
Hao X H, Hu R G, Wu J S, *et al.* Effects of long-term fertilization on paddy soils organic nitrogen, microbial biomass, and microbial functional diversity[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(6): 1477–1484.
- [17] Stewart C E, Paustian K, Conant R T, *et al.* Soil carbon saturation: concept, evidence and evaluation[J]. *Biogeochemistry*, 2007, 86(1): 19–31.
- [18] Stewart C E, Plante A F, Paustian K, *et al.* Soil carbon saturation: linking concept and measurable carbon pools[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2008, 72(2): 379–392.
- [19] 张丽敏, 徐明岗, 娄冀来, 等. 长期有机无机肥配施增强黄壤性水稻土有机氮的物理保护作用[J]. *植物营养与肥料学报*, 2015, 21(6): 1481–1486.
Zhang L M, Xu M G, Lou Y L, *et al.* Combined application of chemical and organic fertilizers long-term increase physical protection of organic nitrogen in yellow paddy soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2015, 21(6): 1481–1486.
- [20] 杨洪波, 史天昊, 徐明岗, 等. 长期不同施肥下肥料氮在黑土不同团聚体有机物中的固持差异[J]. *植物营养与肥料学报*, 2018, 24(2): 357–364.
Yang H B, Shi T H, Xu M G, *et al.* Residing differences of fertilizer

- nitrogen in aggregates of black soil under long-term fertilization treatments[J]. *Journal of plant nutrition and fertilizer*, 2018, 24(2): 357–364.
- [21] Polglase P J, Jokela E J, Comerford N B. Mineralization of nitrogen and phosphorus from soil organic matter in southern pine plantations[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1992, 56(3): 921–927.
- [22] Haynes R J. Labile organic matter fractions as central components of the quality of agricultural soils: an overview[J]. *Advances in Agronomy*, 2005, 85: 221–268.
- [23] 仇少君. 华北平原高累积硝态氮土壤碳氮交互作用机制研究[D]. 北京: 中国农业大学博士论文, 2010.
- Qiu S J. Study on the interaction mechanism of carbon and nitrogen in soil with high accumulation of nitrate nitrogen in north China plain[D]. Beijing: PhD Dissertation of China Agricultural University, 2010.
- [24] 徐阳春, 沈其荣, 茆泽圣. 长期施用有机肥对土壤及不同粒级中酸解有机氮含量与分配的影响[J]. *中国农业科学*, 2002, 35(4): 403–409.
- Xu Y C, Shen Q R, Mao Z S. Contents and distribution of forms of organic n in soil and particle size fractions after long-term fertilization[J]. *Scientia Agricultural Sinica*, 2002, 35(4): 403–409.
- [25] Ros G H, Hoffland E, Temminghoff E J M. Dynamics of dissolved and extractable organic nitrogen upon soil amendment with crop residues[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(12): 2094–2101.
- [26] Smolander A, Kitunen V, Mälkönen E. Dissolved soil organic nitrogen and carbon in a Norway spruce stand and an adjacent clear-cut[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 33(3): 190–196.
- [27] Marschner B, Kalbitz K. Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils[J]. *Geoderma*, 2003, 113(3–4): 211–235.
- [28] Wander M. Soil organic matter fractions and their relevance to soil function[A]. Magdoff F, Weil R R. Soil organic matter in sustainable agriculture[M]. London: CRC Press, 2004: 67–102.
- [29] Balabane M, Balesdent J. Input of fertilizer-derived labelled N to soil organic matter during a growing season of maize in the field[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1992, 24(2): 89–96.
- [30] Schwenke G, Felton W, Herridge D, *et al.* Relating particulate organic matter-nitrogen (POM-N) and non-POM-N with pulse crop residues, residue management and cereal N uptake[J]. *Agronomie*, 2002, 22(7–8): 777–787.
- [31] Hurisso T T, Norton J B, Norton U. Labile soil organic carbon and nitrogen within a gradient of dryland agricultural land-use intensity in Wyoming, USA[J]. *Geoderma*, 2014, 226: 1–7.
- [32] Boyle S A, Yarwood R R, Bottomley P J, *et al.* Bacterial and fungal contributions to soil nitrogen cycling under Douglas fir and red alder at two sites in Oregon[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(2): 443–451.
- [33] Böhme L, Langer U, Böhme F. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments[J]. *Agriculture, ecosystems & environment*, 2005, 109(1–2): 141–152.
- [34] 戚瑞敏. 不同施肥制度潮土有机碳矿化对温度和牛粪的响应及其机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2016.
- Qi R M. Responses of soil organic carbon mineralization under long-term fertilization regimes to temperature changes and cattle manure addition[D]. Beijing: MS Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016.
- [35] Qi R, Li J, Lin Z, *et al.* Temperature effects on soil organic carbon, soil labile organic carbon fractions, and soil enzyme activities under long-term fertilization regimes[J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 102: 36–45.
- [36] Li J, Cooper J M, Lin Z, *et al.* Soil microbial community structure and function are significantly affected by long-term organic and mineral fertilization regimes in the North China Plain[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 96: 75–87.
- [37] Marx M C, Wood M, Jarvis S C. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(12–13): 1633–1640.
- [38] Vance E D, Brookes P C, Jenkinson D S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1987, 19(6): 703–707.
- [39] Wu J, Joergensen R G, Pommerening B, *et al.* Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction-an automated procedure[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1990, 22(8): 1167–1169.
- [40] Wright A L, Provin T L, Hons F M, *et al.* Dissolved organic carbon in soil from compost-amended Bermuda grass turf[J]. *Hort Science*, 2005, 40(3): 830–835.
- [41] Jones D L, Willett V B. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38(5): 991–999.
- [42] Cambardella C A, Elliott E T. Particulate soil organic-matter changes across a grassland cultivation sequence[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1992, 56(3): 777–783.
- [43] DeForest J L. The influence of time, storage temperature, and substrate age on potential soil enzyme activity in acidic forest soils using MUB-linked substrates and L-DOPA[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(6): 1180–1186.
- [44] Saiya-Cork K R, Sinsabaugh R L, Zak D R. The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an Acer saccharum forest soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34(9): 1309–1315.
- [45] Sharifi M, Zebbarh B J, Burton D L, *et al.* Evaluation of some indices of potentially mineralizable nitrogen in soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2007, 71(4): 1233–1239.
- [46] Saffigna P G, Powlson D S, Brookes P C, *et al.* Influence of sorghum residues and tillage on soil organic matter and soil microbial biomass in an Australian Vertisol[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1989, 21(6): 759–765.
- [47] Bremer E, Van Kessel C. Plant-available nitrogen from lentil and wheat residues during a subsequent growing season[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1992, 56(4): 1155–1160.
- [48] Campbell C A, Biederbeck V O, Schnitzer M, *et al.* Effect of 6 years of zero tillage and N fertilizer management on changes in soil quality of an Orthic Brown Chernozem in southwestern Saskatchewan[J]. *Soil and Tillage Research*, 1989, 14(1): 39–52.
- [49] Sainju U M, Whitehead W F, Singh B P, *et al.* Tillage, cover crops, and nitrogen fertilization effects on soil nitrogen and cotton and

- sorghum yields[J]. *European Journal of Agronomy*, 2006, 25(4): 372–382.
- [50] 刘恩科, 赵秉强, 李秀英, 等. 不同施肥制度土壤微生物量碳氮变化及细菌群落16S rDNA V3片段PCR产物的DGGE分析[J]. *生态学报*, 2007, 27(3): 1079–1085.
- Liu E K, Zhao B Q, Li X Y, *et al.* Microbial C and N biomass and soil community analysis using DGGE of 16S rDNA V3 fragment PCR products under different long-term fertilization systems[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(3): 1079–1085.
- [51] 彭佩钦, 仇少君, 童成立, 等. 长期施肥对水稻土耕层微生物生物量氮和有机氮组分的影响[J]. *环境科学*, 2007, 28(8): 1816–1821.
- Peng P Q, Qiu S J, Tong C L, *et al.* Effects of long-term application of fertilizers on soil microbial biomass nitrogen and organic nitrogen components in subtropical paddy soils[J]. *Environmental Science*, 2007, 28(8): 1816–1821.
- [52] 李娟, 赵秉强, 李秀英, 等. 长期有机无机肥料配施对土壤微生物学特性及土壤肥力的影响[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(1): 144–152.
- Li J, Zhao B Q, Li X Y, *et al.* Effects of long-term combined application of organic and mineral fertilizers on soil microbiological properties and soil fertility[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(1): 144–152.
- [53] 高强, 唐艳凌, 巨晓棠, 等. 长期不同施肥处理对土壤活性氮库的影响[J]. *水土保持学报*, 2009, (2): 95–98.
- Gao Q, Tang Y L, Ju X T, *et al.* Effect of long-term fertilization on soil reactive nitrogen pool[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2009, (2): 95–98.
- [54] 龚伟, 颜晓元, 蔡祖聪, 等. 长期施肥对小麦-玉米作物系统土壤颗粒有机碳和氮的影响[J]. *应用生态学报*, 2008, 19(11): 2375–2381.
- Gong W, Yan X Y, Cai Z C, *et al.* Effects of long-term fertilization on soil particulate organic carbon and nitrogen in a wheat-maize cropping system[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(11): 2375–2381.
- [55] 韩晓日, 郑国砥, 刘晓燕, 等. 有机肥与化肥配合施用土壤微生物量氮动态、来源和供氮特征[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(4): 765–772.
- Han X R, Zheng G D, Liu X Y, *et al.* Dynamics, sources and supply characteristic of microbial biomass nitrogen in soil applied with manure and fertilizer[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(4): 765–772.
- [56] 倪进治, 徐建民, 谢正苗. 有机肥料施用后潮土中活性有机质组分的动态变化[J]. *农业环境科学学报*, 2003, 22(4): 416–419.
- Ni J Z, Xu J M, Xie Z M. Dynamic of active organic matter fractions in fluvio-aquic soil after application of organic fertilizers[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2003, 22(4): 416–419.
- [57] 胡玮, 李桂花, 任意, 等. 不同碳氮比有机肥组合对低肥力土壤小麦生物量和部分土壤肥力因素的影响[J]. *中国土壤与肥料*, 2011, (2): 22–27.
- Hu W, Li G H, Ren Y, *et al.* The Effects of combined organic manure in different carbon-to-nitrogen ratio on wheat biomass and soil fertility in low fertility soil[J]. *Chinese Soil and Fertilizer*, 2011, (2): 22–27.
- [58] 姜勇, 梁文举, 闻大中. 免耕对农田土壤生物学特性的影响[J]. *土壤通报*, 2004, 35(3): 347–351.
- Jiang Y, Liang W J, Wen D Z. Effects of no-tillage on soil biological properties in farmlands: a review[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2004, 35(3): 347–351.
- [59] 刘善江, 夏雪, 陈桂梅, 等. 土壤酶的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(21): 1–7.
- Liu S J, Xia X, Chen G M, *et al.* Study progress on functions and affecting factors of soil enzymes[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(21): 1–7.
- [60] 高瑞, 吕家珑. 长期定位施肥土壤酶活性及其肥力变化研究[J]. *中国生态农业学报*, 2005, 13(1): 143–145.
- Gao R, Lv J L. Study on the enzyme activities and fertility change of soils by a long-term located utilization of different fertilizers[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2005, 13(1): 143–145.
- [61] 肖琼, 王齐齐, 邬磊, 等. 施肥对中国农田土壤微生物群落结构与酶活性影响的整合分析[J]. *植物营养与肥料学报*, 2018, 24(6): 1598–1609.
- Xiao Q, Wang Q Q, Wu L, *et al.* Fertilization impacts on soil microbial communities and enzyme activities across China's croplands: a meta-analysis[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2018, 24(6): 1598–1609.
- [62] 孙瑞莲, 赵秉强, 朱鲁生, 等. 长期定位施肥对土壤酶活性的影响及其调控土壤肥力的作用[J]. *植物营养与肥料学报*, 2003, 9(4): 406–410.
- Sun R L, Zhao B Q, Zhu L S, *et al.* Effects of long-term fertilization on soil enzyme activities and its role in adjusting-controlling soil fertility[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2003, 9(4): 406–410.
- [63] 斯贵才, 袁艳丽, 王建, 等. 围栏对当雄县高寒草原土壤微生物和酶活性的影响[J]. *草业科学*, 2015, (1): 1–10.
- Si G C, Yuan Y L, Wang J, *et al.* Effects of fencing on microbial communities and soil enzyme activities in Damxung alpine grassland[J]. *Pratacultural Science*, 2015, (1): 1–10.
- [64] 王涛, 马宇丹, 许亚东, 等. 退耕刺槐林土壤养分与酶活性关系[J]. *生态学报*, 2018, 37(7): 2083–2091.
- Wang T, Ma Y D, Xu Y D, *et al.* Relationship between soil nutrients and enzyme activity in Robinia pseudoacacia plantation[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2018, 37(7): 2083–2091.
- [65] 杨萌, 李永夫, 李永春, 等. 集约经营对毛竹林土壤碳氮库及酶活性的影响[J]. *应用生态学报*, 2016, 27(11): 3455–3462.
- Yang M, Li Y F, Li Y C, *et al.* Effects of intensive management on soil C and N pools and soil enzyme activities in Moso bamboo plantations[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2016, 27(11): 3455–3462.
- [66] 邓婵娟. 长期施肥对稻田土壤氮素转化特征及酶活性的影响[J]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2008.
- Deng C J. Effect of long-term different fertilizations on nitrogen transformation and activity of enzymes in paddy soil[J]. Wuhan: MS Thesis of Huazhong Agricultural University, 2008.
- [67] 蒋跃利. 宁南山区植被恢复对土壤氮素矿化和酶活性的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2014.
- Jiang Y L. Effect of vegetation restoration on soil nitrogen mineralization and enzyme activities in mountainous area of southern Ningxia, Northwest China[D]. Yangling: MS Thesis of Northwest Agriculture & Forestry University, 2014.